Aluna: Simone Silveira Fortes

Orientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira

RESUMO

FORTES, S.S. Estudo de metabolismo in vitro e inibição enzimática do produto natural Licarina A empregando microsossomas hepático de humanos. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Muitos fármacos comercializados tiveram sua origem em produtos naturais e seus derivados. Devido ao grande potencial farmacológico destas novas moléculas pesquisadas, uma etapa importante e inicial no desenvolvimento de um novo fármaco é a avaliação do seu comportamento frente as enzimas do citocromo P450 (CYP 450), incluindo os estudos de interações medicamentosas. Neste contexto, um substrato que merece destaque é a Licarina A (Lic A). Este composto é uma neolignana encontrada em algumas espécies de plantas e vêm demonstrando várias propriedades biológicas promissoras, dentre elas destaca-se a atividade anti-leishmanias. No entanto, para que esta substância com comprovada atividade se torne um fármaco é necessário realizar, na fase pré-clínica, estudos sobre seu perfil metabólico frente às enzimas do CYP450 e estudos de interação medicamentosa. Portanto, esta Tese teve como objetivo determinar os parâmetros enzimáticos utilizando microsossomas hepáticos de humanos através do estudo de metabolismo in vitro com esta molécula e realizar estudos de interação medicamentosa através dos estudos de inibição enzimática e pesquisar a isoforma do CYP450 que metaboliza predominantemente este produto natural através do emprego de enzimas recombinantes de humanos. Primeiramente, foi desenvolvido um método analítico para a determinação do produto natural Licarina A em meio microsossomal. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando a coluna Ascentis C18 e fase móvel composta por metanol: solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (75:25, v/v); a vazão empregada foi de 1,0 mL min⁻¹. O método foi validado na faixa de concentração de 0,383 a 76,65 µmol L⁻¹, com coeficiente de correlação linear de 0,99 e limite de quantificação de 0,383 µmol L⁻¹. A precisão e exatidão apresentaram resultados dentro do recomendável pela ANVISA. Após validação do método, estabeleceram-se as condições lineares para a depleção da Lic A no meio microsossomal e posteriormente, a cinética foi determinada em condições de velocidade inicial utilizando para tanto 0,20 mg mL⁻¹ de concentração de proteínas microsossomais e 20 minutos de tempo de incubação. O comportamento observado na cinética enzimática para a depleção da Lic A foi um comportamento atípico, caracterizada pelo modelo cinético de Hill. Os valores de V_{max}, S₅₀ e coeficiente de Hill foram, 1,651 µmol mg⁻¹ min⁻¹, 3,87 µmol L⁻¹ e 2,0 respectivamente. A partir dos parâmetros cinéticos o valor de clearance intrínseco (CL_{int}) para a Lic A foi de 0,22 mL min⁻¹ mg⁻¹. Posteriormente, a correlação in vitro in vivo foi realizada e foi observado um clearance hepático (CL_{hep}) de 20 mL min⁻¹ kg⁻¹ e taxa de extração hepática (E) de 1. As isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo da Lic A foram CYP 1A2 e 2B6. Os estudos de inibição mostraram que a Lic A é um inibidor fraco frente as isoformas do CYP450 estudadas, com valores de IC₅₀ maiores do que 80 µmol L⁻¹.

Palavras chaves: Licarina A; Metabolismo in vitro; Microsossomas hepáticos humano; Cinética enzimática; Inibição enzimática.

ABSTRACT

FORTES, S.S. **In vitro metabolism and enzymatic inhibition study of the natural product Licarin A employing human liver microsomes.** 2017. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Many marketed drugs had their origin in natural products and their derivatives. Due to the biological potential of these new molecules, an important initial step in the development of a new drug is the evaluation of its behavior in front of cytochrome P450 enzymes (CYP 450), including studies of drug interactions. In this context, a substrate that deserves attention is Licarin A (Lic A). This compound is a neolignan found in some species of plants and several promising biological properties have been describing for this natural product, among them anti-leishmania activity. However, for this substance to become a drug, it is necessary to perform, in the preclinical phase, studies regarding its metabolic profile and drug interactions. Therefore, this thesis aimed to determine the enzymatic parameters by using human liver microsomes through in vitro metabolism study with this molecule and to conduct drug interaction studies through the enzyme inhibition studies and finally, to investigate the CYP450 isoforms that metabolize predominantly this natural product through the use of recombinant human enzymes. Firstly, an analytical method was developed for the quantification of the natural product Licarin A in microsomal medium. The analyzes were performed by high performance liquid chromatography employing an Ascentis C18 column and mobile phase composed of methanol: 0.1% formic acid aqueous solution (75:25, v / v); the flow rate used was 1.0 mL min⁻¹. The method was validated in the concentration range of 0.333 to 76.65 µmol L⁻¹, with a linear correlation coefficient of 0.99 and a quantification limit of 0.333 µmol L⁻¹. Accuracy and precision showed results in agreement with ANVISA guidelines. After method validation, the linear conditions for depletion of Lic A in the microsomal medium were established. Subsequently, the kinetics were determined under initial velocity conditions using 0.20 mg mL⁻¹ of microsomal protein concentration and 20 minutes of incubation time. The behavior observed in the enzymatic kinetics for the depletion of Lic A was an atypical behavior, characterized by the Hill kinetic model. The values of V_{max}, S₅₀ and Hill coefficient were 1.651 µmol mg⁻¹ min⁻¹, 3.87 µmol L⁻¹ and 2.0, respectively. From the kinetic parameters, the intrinsic clearance (CL_{int}) for Lic A was 0.22 mL min⁻¹ mg⁻¹. Subsequently, in vitro in vivo correlation was performed and a hepatic clearance (CL_{hep}) of 20 mL min⁻¹ kg⁻¹ and a hepatic extraction rate (E) of 1 was observed. The CYP450 isoforms involved in the metabolism of Lic A were CYP 1A2 and 2B6. Inhibition studies have shown that Lic A is a weak CYP450 inhibitor, with IC₅₀ values greater than 80 µmol L⁻¹. Although different metabolic pathways of licanin A have been studied and several metabolites were identified, this is the first report about the formation of an in vitro metabolite after metabolism by human liver microsomes. With the aid of mass spectrometry it was possible to identify the metabolite of *m/z* 343 [M+H]⁺, possibly an epoxidized compound, of licanin A.

Keywords: Licarin A; In vitro metabolism; Human liver microsomes; Enzymatic kinetics, Enzyme inhibition.